

# Nederlands Instituut voor Visserijonderzoek (RIVO) BV

Postbus 68  
1970 AB IJmuiden  
Tel.: 0255 564646  
Fax.: 0255 564644  
Internet:postkamer@rivo.dlo.nl

Postbus 77  
4400 AB Yerseke  
Tel.: 0113 572781  
Fax.: 0113 573477

## RIVO Rapport

Nummer: C066/03

### Gebromeerde vlamvertrager gehaltenes en DR-CALUX respons in sediment en zwevende stof van de Noordzeekustzone

H.A.Leslie, P.E.G. Leonards, G. Booij, S. Brandsma, I. van der Veen

Opdrachtgever: RIKZ  
Postbus 207  
9750 AE Haren

Contactpersoon: drs. J. Akerman

Project nummer: 34412280.09

Contract nummer: 65031129

Akkoord: dr. J. de Boer  
Afdelingshoofd Milieu en Voedselveiligheid

Handtekening: \_\_\_\_\_

Datum: 23 december 2003

Aantal exemplaren: 5  
Aantal pagina's: 8  
Aantal tabellen: 2  
Aantal figuren: -  
Aantal bijlagen: 1

In verband met de  
verzelfstandiging van de  
Stichting DLO, waartoe tevens  
RIVO behoort, maken wij sinds 1  
juni 1999 geen deel meer uit van  
het Ministerie van Landbouw,  
Natuurbeheer en Visserij. Wij zijn  
geregistreerd in het  
Handelsregister Amsterdam  
nr. 34135929  
BTW nr. NL 808932184B09.

De Directie van het RIVO is niet aansprakelijk voor gevolgschade, alsmede voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van het RIVO; opdrachtgever vrijwaart het RIVO van aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

Dit rapport is vervaardigd op verzoek van de opdrachtgever hierboven aangegeven en is zijn eigendom. Niets van dit rapport mag weergegeven en/of gepubliceerd worden, gefotokopieerd of op enige andere manier zonder schriftelijke toestemming van de opdrachtgever.

# Inhoudsopgave:

Inhoudsopgave: .....	2
1. Inleiding.....	3
2. Materialen en methoden.....	4
2.1 Soxhlet extractie.....	4
2.2 Opzuivering multilayer silicakolom en DR-CALUX assay .....	4
2.3 Opzuivering gelpermeatiechromatografie (GPC).....	4
2.4 Concentratiebepalingen vlamvertragers .....	5
3. Resultaten .....	5
3.1 DR-CALUX Bioassay .....	5
3.2 Concentratiebepalingen vlamvertragers .....	6
4. Discussie.....	7
5. Conclusie .....	7
6. Referenties .....	8

Bijlage: Concentratiedata vlamvertragers en DR-CALUX data

## 1. Inleiding

In het kader van het RIKZ project 'Lakmoes' wordt de waterkwaliteit van de Waddenzee aan de hand van chemische parameters onderzocht. Omdat de 'nieuwe milieuvuilers', de gebromeerde vlamvertragers al eerder zijn aangetoond in dit gebied [Zegers e.a. 2003], is het belangrijk om inzicht te krijgen in de verspreiding en gehalten van deze verbindingen.

Gebromeerde vlamvertragers zijn in zwevend stof- en sedimentmonsters te analyseren na extractie en opzuiveringsstappen met behulp van gaschromatografie-massa spectrometrie (GC-MS) en vloeistofchromatografie-massa spectrometrie (LC-MS). LC-MS wordt toegepast voor enkele stoffen die slechter meetbaar zijn met GC-MS, in dit geval TBBP-A. Gebromeerde vlamvertragers en andere soorten verontreinigingen kunnen een dioxinewerking hebben op organismen in het Noordzee-ecosysteem. Daarom is het relevant om de mate van dioxineactiviteit in kaart te brengen.

Naast vlamvertragergehalten werd in dezelfde monsters dioxine-achtige activiteit gemeten met behulp van de DR-CALUX assay. DR-CALUX is een afkorting voor "Dioxin Responsive Chemical Activated Luciferase gene eXpression assay," een test die eerst beschreven is door Murk e.a. [1996]. Dioxinen zijn zeer giftige verbindingen die een aantal verschillende toxische effecten kunnen hebben op blootgestelde organismen. De rat hepatomacellen (H4IIE) die gebruikt worden in de DR-CALUX test zijn stabiel getransfekteerd met een plasmide dat het gen van het vuurvliegje (*Photinus pyralis*) bevat. Dit fungeert als reporter gen voor de aanwezigheid van dioxine en dioxine-achtige verbindingen, gekoppeld aan dioxine responsieve elementen (DRE's). Inductie van luciferase leidt tot het afgeven van licht, een proces dat dioxineconcentratie-afhankelijk is. Het licht van deze cellen wordt gemeten en geldt als maat van de hoeveelheid dioxinen of dioxine-achtige verbindingen in het extract waaraan de cellen blootgesteld zijn.

## 2. Materialen en methoden

### 2.1 Soxhlet extractie

Gevriesdroogde en gehomogeniseerde monsters van zwevend stof (16) en sediment (4) werden in glazen monsterpotjes aangeleverd. Monsters werden Soxhlet geëxtraheerd met hexaan:aceton (3:1, v:v) als oplosmiddel volgens de methode voor sediment en biota beschreven door De Boer e.a. [2001]. De extractie van één op de tien monsters werd in duplo uitgevoerd. Twee blanco's en een interne referentie materiaal (Westerschelde sediment) werden meegenomen per tien monsters. Het Nederlands Instituut voor Visserij Onderzoek participeert in de internationale ringtesten voor vlamvertrager analyse, georganiseerd door QUASIMEME, tot nu toe met goede resultaten.

De extracten in hexaan/aceton werden gesplitst na Soxhlet extractie: één deel voor gelpermeatiechromatografie opzuivering en concentratiebepalingen van gebromeerde vlamvertragers en twee delen voor opzuivering met behulp van multilayer silicakolommen.

### 2.2 Opzuivering multilayer silicakolom en DR-CALUX assay

Met deze 'klassieke' opzuiveringsmethode worden voornamelijk PCBs en dioxinen uit het Soxhletextract gefractioneerd. Voor deze stappen is het SPECIE protocol gevolgd [Peters, 2000]. Na de opzuivering, werd de helft van het extract in hexaan naar BioDetection Systems b.v. (BDS) gestuurd voor het uitvoeren van de DR-CALUX assay. BDS heeft de opgezuiverde extracten met de DR-CALUX assay getest op aanwezigheid van dioxine en dioxine-achtige verbindingen (24 uren blootstelling; 0.8% DMSO tijdens blootstelling). De andere helft van het opgezuiverde extract werd overgebracht in DCM en naar drs. J. Akerman (RIKZ-Haren) gestuurd voor evt. verdere analyses door het RIKZ zelf.

### 2.3 Opzuivering gelpermeatiechromatografie (GPC)

Een deel van de Soxhletextracten was bestemd voor opzuivering met gelpermeatiechromatografie (GPC) en vlamvertrager bepalingen. De methode zoals beschreven in De Boer e.a. [2001] werd gevolgd. Omdat TBBP-A werd gemeten, werd het extract eerst behandeld met pH=2 water. Het extract werd vervolgens behandeld met zwavelzuur.

Het extract werd op een silica kolom gebracht en geëluëerd met iso-octaan en vervolgens diethylether/iso-octaan (15:85, v:v). Het extract dat opgevangen werd, is vervolgens ingedampt en in een GC-vial overgebracht.

## 2.4 Concentratiebepalingen vlamvertragers

Polybroomdifenylothers (PBDEs), polybroombifenylen (PBBs), hexabroomcyclododecaan (HBCD) en dimethyl-tetrabroombisfenol-A (Me-TBBP-A) in de extracten werden gemeten met behulp van GC/MS-NCI. De GC/MS-NCI methode is ook beschreven in het gecertificeerde werkvoorschrift A-102 (Sterlab L097) [Hesselingen en Brandsma, 2003] voor biota. De extracten werden vervolgens in methanol overgebracht voor de metingen van tetrabroombisfenol-A (TBBP-A) met een LC-MS methode die ontwikkeld is op het RIVO. Tabel 1 geeft de gemeten stoffen weer.

*Tabel 1. PBBs, PBDEs en overige gebromeerde vlamvertragers die geanalyseerd werden met GC-MS met uitzondering van TBBP-A die gemeten werd met LC-MS.*

BB 15	BDE 28	BDE 85	BDE 190
BB 49	BDE 47	BDE 99	BDE 209
BB 52	BDE 49	BDE 100	
BB 101	BDE 66	BDE 119	HBCD
BB 153	BDE 71	BDE 138	Me-TBBP-A
BB 169	BDE 75	BDE 153	TBBP-A
	BDE 77	BDE 154	

## 3. Resultaten

### 3.1 DR-CALUX Bioassay

De DR-CALUX toonde dioxine-activiteit aan in elk monster (tabel 2 en bijlage). De hoogste waarde werd gevonden in zwevend stof. De toxiciteit van dioxine-achtige verbindingen wordt vaak vergeleken met die van 2,3,7,8-TCDD, de meest toxische congener. De waardes voor de dioxine of dioxine-achtige activiteit worden uitgedrukt in pg 2,3,7,8-tetrachloordibenzo(p)dioxine (TCDD) toxiciteits-equivalent (TEQ) per gram monster (drooggewicht) (tabel 2). De getallen in tabel 2 geven aan hoeveel pg 2,3,7,8-TCDD er per gram extract aanwezig zou moeten zijn om dezelfde waargenomen respons te geven. Deze gegevens zijn ook opgenomen in de bijlage die elektronisch wordt aangeleverd.

### 3.2 Concentratiebepalingen vlamvertragers

Gebromeerde vlamvertragers werden aangetoond in verschillende mate in alle monsters. Gehaltes gebromeerde vlamvertragers (?g/kg d.s.) in de zwevend stof- en sedimentmonsters uit het Noordzeekustgebied worden weergegeven in de bijlage, die ook elektronisch wordt aangeleverd als excelbestand. Geen BBs zijn gedetecteerd. BDE 209 en HBCD waren duidelijk aanwezig in alle monsters. BDE 153 werd niet gerapporteerd omdat de piek van <sup>13</sup>C-TBBP-A, die als interne standaard werd gebruikt, samenviel met deze stof.

*Tabel 2. DR-CALUX activiteit van zwevend stof en sediment (pg 2,3,7,8-TCDD-TEQ/g drooggewicht) met standaard deviatie (S.D.).*

RIKZ monstercode	Locatie	Monstertype	TCDD-TEQ (pg/g)	S.D.
10033850	ZS1	zwevend stof	26,8	1,2
10033852	ZS2	zwevend stof	12,6	0,3
10033854	ZS3	zwevend stof	26,1	0,7
10033856	ZS4	zwevend stof	30,9	1,7
10033629	ZS5	zwevend stof	17,6	0,2
10033860	ZS6	zwevend stof	21,4	1,1
10033862	ZS7	zwevend stof	18,2	0,9
10033864	ZS8	zwevend stof	26,2	1,4
10033867	ZS9	zwevend stof	28,8	1,2
10033869	ZS10	zwevend stof	25,8	0,3
10033884	ZS11	zwevend stof	29,7	1,5
10033874-1	ZS12	zwevend stof	23,5	0,4
10033916-1	ZS13	zwevend stof	16,1	1,6
10033878	ZS14	zwevend stof	45,3	0,7
10033880	ZS16	zwevend stof	26,1	0,7
10033888	ZS19	zwevend stof	17,7	0,5
10033760	S1	sediment	15,3	0,7
10033775	S2	sediment	17,7	0,9
10033753	S3	sediment	32,8	0,6
10033780	S4	sediment	18,3	1,2

## 4. Discussie

De resultaten van de DR-CALUX test wijzen op de aanwezigheid van stoffen met een dioxine werking in de extracten van de sediment- en zwevend stofmonsters. Gehaltes van de vlamvertragers kunnen de dioxine respons van de DR-CALUX test niet (volledig) verklaren omdat met de extractiemethode niet alleen vlamvertragers maar ook andere stoffen met dioxine werking werden geëxtraheerd voor de DR-CALUX test. Sommige van deze zouden ook veel sterkere dioxine werkingen kunnen hebben dan de vlamvertragers zelf. Deze resultaten geven aan dat in het Noordzeekustgebied bij een aantal locaties hoge concentraties gebromeerde vlamvertragers aanwezig zijn, met name BDE 209 en HBCD. Ook zijn er enkele locaties met hogere dioxine respons dan de rest.

## 5. Conclusie

In alle monsters werden gebromeerde vlamvertragers gedetecteerd en een dioxine repons gemeten. Van alle vlamvertragers kwamen BDE 209 en HBCD het meest voor.

## 6. Referenties

- Peters, R. 2000. Opwerking van monsters sediment voor de bepaling van de aanwezigheid van dioxine-achtige stoffen met behulp van de DR-CALUX assay. Standaardvoorschrift concept RIKZ/SPECIE-7& RIKZ/BCI. 6 pp.
- Hesselingen J.M. en S.H. Brandsma 2003. Biota: Bepaling van het gehalte aan gebromeerde vlamvertragers (polybroomdifenylethers, polybroombifenylen en hexachloordodecaan) met behulp van GC/NCI-MS. Standaardwerkvoorschrift A.102, Nederlands Instituut voor Visserij Onderzoek, afdeling Milieu & Voedselveiligheid, 22 pp.
- De Boer, J., K. de Boer en J.P. Boon. 2000. Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 3K: New Types of Persistent Halogenated Compounds, red. J. Paasivirta, Springer-Verlag, New York, blz. 61-95.
- De Boer, J., C. Allchin, R. Law, B. Zegers en J.P. Boon. 2001. Method for the analysis of polybrominated diphenylethers in sediments and biota. *TRAC-Trends Anal Chem* 20, 591-599.
- Zegers, B.N., W.E. Lewis, K. Booj, R.H. Smittenberg, W. Boer, J. de Boer en J.P. Boon. 2003. Levels of polybrominated diphenyl ether flame retardants in sediment cores from Western Europe. *Environ Sci Technol* 37, 3803-3807.
- Murk A.J., Legler J., Denison M.S., Giesy J.P., van de Guchte C. en Brouwer, A. 1996. Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX): A novel in vitro bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water. *Fund Appl Toxicol* 33, 49-160.



## Bijlage

Gebromeerde vlamvertrager gehaltenes in sediment en zwevend stof, DR-CALUX data, en gewicht (g) gevriesdroogde monster per extract in DCM.

Bijlage bij RIVO rapport nr. C066/03

**RIKZ Noordzeesediment en zwevend stof**

**Data gebromeerde vlamvertragers en DR-CALUX test**

RIVO monstercode	1787	1788	1789	1790	1791	1792	1793	1794	1795	1796
<b>RIKZ monstercode</b>	<b>10033850</b>	<b>10033852</b>	<b>10033854</b>	<b>10033856</b>	<b>10033629</b>	<b>10033860</b>	<b>10033862</b>	<b>10033864</b>	<b>10033867</b>	<b>10033869</b>
Locatie	ZS1	ZS2	ZS3	ZS4	ZS5	ZS6	ZS7	ZS8	ZS9	ZS10
Monstertype	zwevend stof	zwevend stof	zwevend stof	zwevend stof	zwevend stof	zwevend stof	zwevend stof	zwevend stof	zwevend stof	zwevend stof
monster (g d.s.) per DCM extract	4,8	5,15	4,999	5,285	5,016	4,958	4,906	5,192	5,274	3,364

**DR-CALUX activiteit:**

pg TCDD-TEQ/g	26,8	12,6	26,1	30,9	17,6	21,4	18,2	26,2	28,8	25,8
standaard deviatie	1,2	0,3	0,7	1,7	0,2	1,1	0,9	1,4	1,2	0,3

**Gebromeerde vlamvertragers**

**Polybroombifenylen (PBBs)**

BB 15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BB 49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BB 52	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BB 101	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BB 153	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BB 169	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**Polybroomdifenyloethers (PBDEs)**

BDE 28	<0.05	0,03	0,03	0,07	0,05	0,07	0,03	0,05	0,05	0,03
BDE 47	0,8	0,4	0,3	0,4	0,4	0,5	0,2	0,4	0,3	<0.2
BDE 49	0,06	0,02	0,03	0,04	0,03	0,03	0,02	0,04	0,03	0,03
BDE 66	<0.05	<0.05	<0.05	<0.04	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.04	<0.07
BDE 71	<0.05	<0.05	<0.05	<0.04	<0.05	<0.05	<0.05	<0.04	<0.04	<0.07
BDE 75	<0.05	<0.05	0,04	0,08	0,05	<0.05	0,06	0,07	0,09	0,09
BDE 77	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0,08	0,02	0,05
BDE 85	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02
BDE 99	0,5	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,2	0,3	0,3	<0.3
BDE 100	0,2	0,1	0,07	0,08	0,09	0,1	0,05	0,07	0,06	0,07
BDE 119	<0.05	<0.04	<0.05	<0.04	<0.05	<0.05	<0.05	<0.04	<0.04	<0.07
BDE 138	<0.05	<0.04	<0.05	<0.04	<0.05	<0.05	<0.05	<0.04	<0.04	<0.07
BDE 154	0,08	0,07	0,05	0,07	0,06	0,06	0,05	0,06	0,06	0,07
BDE 183	0,04	0,04	0,08	0,06	0,06	0,07	0,03	0,06	0,05	0,05
BDE 190	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.4
BDE 209	27	14	19	26	21	30	14	21	20	12

**Overige vlamvertragers**

Me-TBBP-A	<0.02	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.02
HBCD	13	27	14	29	14	13	15	10	16	6
TBBP-A	<2.3	<2.1	<2.2	<2.0	<2.2	<2.2	<2.2	<2.1	<2.0	<3.2

n.d. is niet gedetecteerd

	1797	1798	1799	1800	1801	1802	1783	1784	1785	1786
<b>RIKZ monstercode</b>	<b>10033884</b>	<b>10033874</b>	<b>10033916-1</b>	<b>10033878</b>	<b>10033880</b>	<b>10033888</b>	<b>10033760</b>	<b>10033775</b>	<b>10033753</b>	<b>10033780</b>
Locatie	ZS11	ZS12	ZS13	ZS14	ZS16	ZS19	S1	S2	S3	S4
Monstertype	zwevend stof	zwevend stof	zwevend stof	zwevend stof	zwevend stof	zwevend stof	sediment	sediment	sediment	sediment
monster (g d.s.) per DCM extract	5,1	3,335	3,335	5,135	5,633	4,964	5,047	5,024	5,051	5,053

**DR-CALUX activiteit:**

pg TCDD-TEQ/g	29,7	23,5	16,1	45,3	26,1	17,7	15,3	17,7	32,8	18,3
standaard deviatie	1,5	0,4	1,6	0,7	0,7	0,5	0,7	0,9	0,6	1,2

**Gebromeerde vlamvertragers****Polybroombifenylen (PBBs)**

BB 15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BB 49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BB 52	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BB 101	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BB 153	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BB 169	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**Polybroomdifenyloethers (PBDEs)**

BDE 28	<0,05	0,05	0,07	0,13	0,07	0,06	0,05	0,09	0,06	0,09
BDE 47	0,48	0,3	0,57	1,3	0,87	<0,4	0,1	0,5	0,5	0,5
BDE 49	0,08	0,07	0,13	0,2	0,1	0,1	0,02	0,10	0,13	0,13
BDE 66	<0,05	<0,06	<0,07	<0,05	0,04	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
BDE 71	<0,05	<0,06	<0,07	<0,05	<0,04	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
BDE 75	0,05	0,07	0,1	0,1	0,1	0,1	0,06	0,1	0,09	0,06
BDE 77	0,03	<0,07	<0,07	<0,05	<0,04	<0,05	0,05	<0,05	<0,05	<0,05
BDE 85	0,02	<0,06	0,20	0,07	0,04	<0,02	<0,04	0,03	0,03	<0,04
BDE 99	0,5	0,2	0,60	1,1	<0,04	<0,3	0,1	0,5	0,4	0,4
BDE 100	0,09	0,08	0,16	0,3	0,21	0,09	1,4	0,1	0,1	0,1
BDE 119	<0,05	<0,06	<0,07	<0,05	<0,04	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
BDE 138	<0,05	<0,06	<0,07	<0,05	<0,04	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
BDE 154	0,07	0,07	0,09	0,22	0,1	0,06	0,17	0,11	0,11	0,15
BDE 183	0,04	0,09	0,08	0,1	0,07	0,07	0,3	0,2	0,1	0,08
BDE 190	<0,2	<0,3	<0,4	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
BDE 209	20	190	100	91	42,2	140	74	21	38	35

**Overige vlamvertragers**

Me-TBBP-A	0,02	<0,02	<0,02	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
HBCD	11	37	35	47	35	32	16	12	16	15,0
TBBP-A	<2,1	<2,9	<3,2	<2,1	<1,9	<2,2	<2,1	<2,1	<2,1	<2,1

n.d. is niet gedetecteerd